

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of :
Ludwig STÖCKL : **PROCESS AND DEVICE FOR THE**
 : **PARALLEL PREPARATION OF AT**
Serial No. Not Yet Assigned : **LEAST 4n OLIGONUCLEOTIDES**
Filed Concurrently Herewith :

Pittsburgh, Pennsylvania
October 26, 2001

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents
Washington D.C. 20231

Sir:

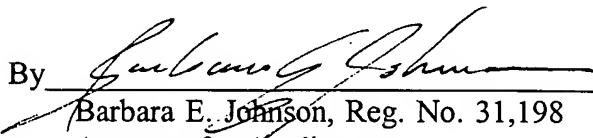
Attached hereto is a certified copy of German Patent Application No. 199 19 607.9, which corresponds to the above-identified United States application and which was filed in the German Patent Office on April 29, 1999.

The priority benefits provided by Section 119 of the Patent Act of 1952 are claimed for this application.

Respectfully submitted,

WEBB ZIESENHEIM LOGSDON
ORKIN & HANSON, P.C.

By


Barbara E. Johnson, Reg. No. 31,198
Attorney for Applicant
700 Koppers Building
436 Seventh Avenue
Pittsburgh, PA 15219-1818
Telephone: 412/471-8815
Facsimile: 412/471-4094

LUDWIG STÖCKL
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Jc971 U.S. PTO
10/040082
10/26/01

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 19 607.9

Anmeldetag: 29. April 1999

Anmelder/Inhaber: Metabion GmbH Gesellschaft für angewandte
Biotechnologie , Planegg/DE

Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zur parallelen Herstellung
von wenigstens 4n Oligonukleotiden

IPC: C 07 H, C 07 B und B 01 J

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Verfahren und Vorrichtung zur parallelen Herstellung von
wenigstens $4n$ Oligonukleotiden

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur parallelen Herstellung von wenigstens $4n$ Oligonukleotiden.

10 Aus der DE 42 06 488 A1 sind ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Herstellung von Oligonukleotiden bekannt. Die bekannte Vorrichtung weist vier übereinanderliegende Stäbe auf, deren Kontaktflächen durch Schleifen und Polieren so bearbeitet sind, daß die Stäbe spaltfrei relativ zueinander verschoben werden können. Einer der Stäbe enthält Reaktionsräume, die über Zu-
15 und Abgangsleitungen in den übrigen Stäben befüllt und entleert werden können. Die einzelnen Reaktionsräume werden nacheinander mit Reagenzien befüllt. Damit die erwähnten Kontaktflächen der verschiebbaren Stäbe gegeneinander gut abdichten, ist eine sehr präzise Bearbeitung dieser Kontaktflächen notwendig und die
20 Stäbe müssen aus verschleißbeständigem Material bestehen, beispielsweise aus rostfreiem Stahl oder aus bestimmten Glaswerkstoffen.

25 Der Bedarf an Oligonukleotiden steigt ständig und es besteht daher der Wunsch, eine möglichst große Anzahl von Oligonukleotiden kostengünstig, in kurzer Zeit und mit hoher Qualität herzustellen. Dabei kann es sich um gleichartige oder um verschiedene Oligonukleotide handeln.

30 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren und eine verbesserte Vorrichtung zur Herstellung von Oligonukleotiden bereitzustellen, die dem zuvor genannten Wunsch Rechnung trägt.

35 Diese Aufgabe ist erfindungsgemäß durch das im Patentanspruch 1 angegebene Verfahren zur parallelen Herstellung von wenigstens $4n$ Oligonukleotiden gelöst. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden wenigsten vier Einschübe mit je n Reaktionsgefäßen

($n \geq 1$) auf bzw. in einem Teller derart angeordnet, daß ein erster Einschub sich an einer ersten Station, ein zweiter Einschub sich an einer zweiten Station, ein dritter Einschub sich an einer dritten Station, und ein vierter Einschub sich an einer vierten Station befinden. Jedes Reaktionsgefäß enthält eine zur Synthese von Oligonukleotiden erforderliche Startbase, die beispielsweise an einen inerten Träger gebunden ist. Anstelle einer Startbase kann auch ein Fachleuten bekannter, sogenannter Universalträger verwendet werden. Als Trägermaterial kann z.B. poröses Glas, sogenanntes controlled pore glass (CPG) verwendet werden. An den genannten vier Stationen werden dann parallel eine Reihe von Operationen zur Oligonukleotidsynthese durchgeführt.

So wird gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der ersten Station befindenden Einschubs eine sogenannte Deblock-Operation durchgeführt, mit der an den Startbasen vorhandene Schutzgruppen abgespalten werden, um später einzelne Nukleotid-Bausteine an die Startbase ankoppeln zu können. Diese Schutzgruppen werden auch als DMT-Gruppen bezeichnet. Gleichzeitig mit der an der ersten Station stattfindenden Deblock-Operation findet an der zweiten Station, wiederum gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen, die sich an der zweiten Station befinden, eine erste Wasch-Operation statt, mit der die zuvor abgespaltenen Schutzgruppen aus den Reaktionsgefäßen ausgewaschen werden. Ebenfalls gleichzeitig mit den beiden zuvor genannten Operationen findet in allen sich an der dritten Station befindenden n Reaktionsgefäßen eine sogenannte Coupling-Operation statt, mittels derer die gewünschten einzelnen Nukleotide an die sich in den Reaktionsgefäßen befindenden Startbasen oder Nukleotidketten angekoppelt werden. Wiederrum zeitgleich mit den vorgenannten drei Operationen findet gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der vierten Station befindenden Einschubes eine Abfolge von Operationen statt, nämlich zunächst eine zweite Wasch-Operation, an die sich eine sogenannte Capping-Operation anschließt, mittels derer in den Reaktionsgefäßen diejenigen Oligonukleotide blockiert werden, die in der vorangegangenen Coupling-Operation

nicht die gewünschte Kettenverlängerung erfahren haben, gefolgt von einer dritten Wasch-Operation, an die sich eine Oxidations-Operation zum Stabilisieren des Phosphat-Grundgerüsts der Oligonukleotide anschließt, und schließlich eine vierte Wasch-Operation.

Erfindungsgemäß wird entweder der Drehteller stationsweise durch die genannten vier Stationen rotiert, so daß jeder Einschub die einzelnen Stationen nacheinander durchläuft, oder die Stationen werden relativ zu den Einschüben jeweils eine Station weiterbewegt. Diese stationsweise Relativbewegung zwischen den Einschüben und den Stationen erfolgt solange, bis die gewünschten Oligonukleotide durch Aneinanderkoppeln der einzelnen Nukleotide entstanden sind.

Der erfindungsgemäß mittels des Durchlaufens der vier Stationen realisierte Syntheszyklus an sich ist bekannt und braucht daher nicht im einzelnen erläutert zu werden. Allerdings wird mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens dieser Syntheszyklus extrem zeitsparend abgearbeitet, indem zum einen alle sich an einer Station befindenden n Reaktionsgefäße zugleich der an dieser Station stattfindenden Operation bzw. den dort stattfindenden Operationen unterzogen werden, und indem zum zweiten parallel an allen vier Stationen Operationen stattfinden. Des weiteren nutzt das erfindungsgemäße Verfahren auf intelligente Weise den Umstand, daß die an der ersten Station ausgeführte Deblock-Operation und die an der dritten Station ausgeführte Coupling-Operation die am längsten dauernden Operationen sind (und damit die notwendige Verweilzeit pro Station vorgeben), indem die deutlich schnelleren Capping- und Oxidations-Operationen nacheinander an nur einer Station (der vierten Station) durchgeführt werden.

Beide Maßnahmen führen dazu, daß das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber bekannten Verfahren zur Oligonukleotidsynthese erheblich schneller ist. Die Produktivität ist auf diese Weise erhöht und die Herstellkosten für Oligonukleotide können gesenkt werden. Darüber hinaus können größere Mengen an Oligonu-

kleotiden in kürzerer Zeit zur Verfügung gestellt werden. Sind beispielsweise pro Einschub 24 Reaktionsgefäße vorhanden und wird als Taktzeit pro Station eine Zeitdauer von 60 Sekunden veranschlagt, dann lassen sich innerhalb von ca. 90 Minuten 96 Oligonukleotide mit je 20 Nukleotidbausteinen erzeugen. Geht man ferner davon aus, daß etwa alle 100 Minuten ein neuer Durchlauf gestartet werden kann, erreicht man mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Produktion von 1.350 Oligonukleotiden pro Tag. Dies entspricht nahezu der 40-fachen Menge, die mit dem Gerät gemäß der eingangs genannten DE 42 06 488 A1 hergestellt werden kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens findet an der zweiten Station zusammen mit der dort durchgeführten ersten Wasch-Operation eine Monitoring-Operation statt, die Aufschluß über die Qualität der an der ersten Station durchgeführten Deblock-Operation gibt. Vorzugsweise erfolgt diese Monitoring-Operation mittels einer Online-Messung der Leitfähigkeit einer für die erste Wasch-Operation verwendeten Waschflüssigkeit. Alternativ kann die Monitoring-Operation mittels einer Online-Messung der Farbtintensität der für die erste Wasch-Operation verwendeten Waschflüssigkeit erfolgen, wobei insbesondere eine Messung mittels UV-Licht verwendet wird. Die Wellenlänge des verwendeten UV-Lichtes hat vorzugsweise eine Wellenlänge von 455 - 465 nm.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dann, wenn an der zweiten Station zusätzlich zur ersten Wasch-Operation auch die Monitoring-Operation stattfindet, die erste Wasch-Operation solange durchgeführt, bis die Monitoring-Operation ergibt, daß die in der vorangegangenen Deblock-Operation entfernten Schutzgruppen vollständig ausgespült sind. Der Begriff "vollständig" ist dabei nicht in einem absoluten Sinne zu verstehen, sondern bezieht sich auf die Nachweisgrenze des im Rahmen der Monitoring-Operation verwendeten Meßverfahrens. Durch eine solche Verfahrensweise wird der Verbrauch an Waschflüssigkeit reduziert, weil aufgrund der kontinuierlichen Überwachung und

Auswertung der die Reaktionsgefäße verlassenden Waschflüssigkeit die erste Wasch-Operation sofort beendet wird, wenn das gewünschte Ergebnis erreicht ist. Des weiteren wird mit einer solchen Verfahrensweise eine Qualitätssteigerung erzielt, da
5 die erste Wasch-Operation nicht nach einer vorgegebenen Zeitdauer beendet wird, sondern ihre Beendigung vom Erreichen eines bestimmten Ergebnisses abhängt.

Vorteilhaft wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren bei der an
10 der dritten Station durchgeführten Coupling-Operation eine ausgewählte Nukleotid-Base gleichzeitig mit einem Aktivator (Katalysator) den Reaktionsgefäßen zugegeben. Diese gleichzeitige Zugabe von Nukleotid-Baustein und Aktivator spart wertvolle Zeit bei einer Operation, die wie oben ausgeführt
15 taktzeitbestimmend ist. Als Aktivator wird vorzugsweise Tetrazol verwendet.

Des weiteren wird bei der an der dritten Station durchgeführten Coupling-Operation falls gewünscht auch eine Markierungsgruppe
20 (label) den Reaktionsgefäßen zugegeben, die eine spätere Identifikation des erzeugten Oligonukleotids oder eines daraus erzeugten Produktes erleichtert. Die Markierungsgruppe ist insbesondere ein Basenanalogon, ein Farbstoff oder ein Hapten.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise als Durchflußverfahren ausgestaltet, d.h. die Reaktionsgefäße sind als Durchflußgefäße ausgebildet, beispielsweise indem jedes Reaktionsgefäß oben und unten durch einen Frittenboden verschlossen ist. Die den Reaktionsgefäßen zuzuführenden Flüssigkeiten
30 (Reagenzien, Waschflüssigkeit etc.) werden bei einem solchermaßen ausgestalteten Verfahren vorzugsweise durch Anlegen eines Druckgefälles zwischen jedem Reaktionsgefäßeinlaß und jedem Reaktionsgefäßauslaß in die einzelnen Reaktionsgefäße hinein und aus ihnen heraus befördert. Das Druckgefälle kann entweder
35 durch einen Überdruck in den Vorratsbehältern für die Reagenzien, Waschflüssigkeiten etc. oder durch Anlegen eines Unterdrucks an die Reaktionsgefäßauslässe erzeugt werden. Dabei muß der Einlaß jedes Reaktionsgefäßes nicht unbedingt oben angeord-

net sein, sondern kann sich durchaus auch unten befinden, während der Reaktionsgefäßauslaß oben angeordnet ist. Eine solche Anordnung hat den Vorteil, daß die jedem Reaktionsgefäß von unten zugegebenen Flüssigkeiten und Reagenzien das in den Reaktionsgefäßen enthaltene Trägermaterial, beispielsweise die Glaskügelchen, hochwirbeln und auf diese Weise eine bessere Durchmischung der zugegebenen Flüssigkeit im Reaktionsgefäß ermöglichen.

Die eingangs genannte Aufgabe ist erfindungsgemäß auch durch eine Vorrichtung zur parallelen Herstellung von wenigstens 4n Oligonukleotiden gelöst, die eine erste Station zur Durchführung einer Deblock-Operation, eine zweite Station zur Durchführung einer ersten Wasch-Operation, eine dritte Station zur Durchführung einer Coupling-Operation, und eine vierte Station aufweist, an der nacheinander eine zweite Wasch-Operation, eine Capping-Operation, eine dritte Wasch-Operation, eine Oxidations-Operation und eine vierte Wasch-Operation durchgeführt werden. Die genannten vier Stationen sind in Umfangsrichtung aufeinanderfolgend angeordnet und haben voneinander in Umfangsrichtung vorzugsweise einen gleichen Abstand.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfaßt des weiteren einen Teller, in dem wenigstens vier Einschübe mit je n Reaktionsgefäßen derart angeordnet werden können, daß ein erster Einschub sich an der ersten Station, ein zweiter Einschub sich an der zweiten Station, ein dritter Einschub sich an der dritten Station, und ein vierter Einschub sich an der vierten Station befindet. Vorzugsweise ist der die Einschübe aufnehmende Teller als Drehteller ausgebildet, der stationsweise durch die genannten vier Stationen rotiert werden kann. Ebenso ist es jedoch möglich, die Stationen relativ zu dem die Einschübe enthaltenden Teller zu bewegen.

Jedes Reaktionsgefäß ist als Durchflußgefäß mit einem Reaktionsgefäßeinlaß und einem gegenüber angeordneten Reaktionsgefäßauslaß ausgeführt. In jeder der vier Stationen ist den Reaktionsgefäßeinlässen eine Flüssigkeits-Zuführeinrichtung

zugeordnet. Die der dritten Station zugeordnete Zuführeinrichtung weist vorzugsweise n Zuführventile auf, damit jedem Reaktionsgefäß selektiv ein bestimmter Nukleotidbaustein zugegeben werden kann. In den übrigen Stationen ist es nicht erforderlich, die Zuführeinrichtung mit n Zuführventilen zu versehen, denn die dort ablaufenden Operationen werden hinsichtlich aller Reaktionsgefäße mit den gleichen Reagenzien oder Flüssigkeiten durchgeführt. Unter bestimmten Umständen ist es allerdings auch für die Zuführeinrichtungen der restlichen Stationen wünschenswert, diese mit jeweils n Zuführventilen zu versehen, beispielsweise dann, wenn unterschiedlich lange Oligonukleotide erzeugt werden sollen. Es ist dann nämlich möglich, die kürzerkettigen, bereits fertigen Oligonukleotide von weiteren, unnötigen Deblock-Operationen auszunehmen, indem die den entsprechenden Reaktionsgefäßen zugeordneten Zuführventile der ersten Station einfach nicht mehr geöffnet werden. Eine wiederholt ausgeführte, unnötige Deblock-Operation kann nämlich bei bereits fertigen Oligonukleotiden zu einer Qualitätsverschlechterung führen, weil einzelne Basen der Oligonukleotide herausgetrennt werden, wodurch das betreffende Oligonukleotid verändert bzw. zerstört wird. Des weiteren läßt sich dann, wenn die Zuführeinrichtung jeder Station mit n Zuführventilen versehen ist, der Verbrauch an Reagenzien und anderen Flüssigkeiten minimieren, weil diese nur noch den Reaktionsgefäßen zugeleitet werden, in denen sie tatsächlich benötigt werden.

Jedem Reaktionsgefäßauslaß ist in jeder Station ein Ablaßkanal zugeordnet, in den die aus den Reaktionsgefäßen austretenden Flüssigkeiten fließen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist so ausgestaltet, daß sich dann, wenn sich die Einschübe in einer Station befinden, jeder Reaktionsgefäßeinlaß in dichtendem Eingriff mit der zugehörigen Zuführeinrichtung und jeder Reaktionsgefäßauslaß in dichtendem Eingriff mit dem zugehörigen Ablaßkanal befindet. Gemäß einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind die Reaktionsgefäßeinlässe oben und die Reaktionsgefäßauslässe unten angeordnet. Die Anordnung kann jedoch auch umgekehrt sein, so daß den Reaktionsgefäßen die Reagenzien und die sonstigen Flüssigkeiten von unten zuge-

geben werden. Dies kann bezüglich der Durchmischung in den Reaktionsgefäßen von Vorteil sein.

Wenn eine Relativbewegung um eine Station durchgeführt wird, besteht zumindest zwischen den Reaktionsgefäßeinlässen und der Zuführeinrichtung bzw. den Zuführventilen ein kleiner axialer Abstand. Auf diese Weise ist der Verschleiß der Dichtflächen deutlich herabgesetzt und es besteht dennoch kaum eine Möglichkeit des Zutritts unerwünschter Stoffe zu den Reaktionsgefäßen.

Gemäß einer Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung befindet sich letztere in einem abgeschlossenen Raum mit einer Inertgas-Umgebung, so daß die Oligonukleotidsynthese nicht durch Wasser bzw. Wasserdampf beeinträchtigt werden kann. Das Inertgas, beispielsweise Argon oder Stickstoff, kann vorteilhaft oben auf die erfindungsgemäße Vorrichtung kontinuierlich aufgegeben werden und sinkt dann langsam über die Vorrichtung herab. Auf diese Weise ist der Inertgasverbrauch vermindert, denn es wird lediglich die Vorrichtung selbst mit einem schützenden Mantel aus Inertgas umgeben.

Bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht auch zwischen den Reaktionsgefäßauslässen und den Abblaßkanälen ein kleiner axialer Abstand, während die stationweise Relativbewegung stattfindet. Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Vorrichtung dabei so ausgestaltet, daß alle Flüssigkeits-Zuführeinrichtungen in oder auf einer Ventilträgerplatte und alle Abblaßkanäle in einer Absaugplatte aufgenommen sind. Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfaßt demnach in dieser Ausführungsform als wesentliche Bestandteile drei übereinander angeordnete Platten, von denen die mittlere Platte der Teller ist. Die Ventilträgerplatte und die Absaugplatte haben eine plane Anlagefläche zum Teller und die Reaktionsgefäßeinlässe sind vorzugsweise bündig mit der Oberseite des Tellers und die Reaktionsgefäßauslässe vorzugsweise bündig mit der Unterseite des Tellers ausgebildet, so daß durch einfaches Aneinanderlegen der Ventilträgerplatte, des Tellers und der Absaugplatte eine dichte Verbindung zwischen den Reaktionsgefä-

Ben und den Zuführventilen sowie den Ablaßkanälen erhalten werden kann. Zur einwandfreien und kostengünstigen Abdichtung können beispielsweise Dichtringe aus einem Elastomermaterial in der planen Anlagefläche der Ventilträgerplatte und der planen Anlagenfläche der Absaugplatte aufgenommen sein, die jeden Reaktionsgefäßeinlaß dicht mit dem entsprechenden Zuführventil und jeden Reaktionsgefäßauslaß dicht mit dem zugehörigen Ablaßkanal verbinden.

10 In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind die Ventilträgerplatte und die Absaugplatte drehfest und der Drehteller sowie die Absaugplatte sind relativ zur Ventilträgerplatte absenkbar. Zum Drehen des Drehtellers um eine Station wird letzterer zusammen mit der Absaugplatte geringfügig gegenüber der Ventilträgerplatte abgesenkt, 15 um eine Station gedreht, und dann wieder in Anlage mit der Ventilträgerplatte nach oben verfahren. Dabei wird die Absaugplatte etwas weiter als der Drehteller abgesenkt, so daß zwischen der Absaugplatte und dem Drehteller ein kleiner Spalt 20 besteht und die vorhandenen Dichtungen beim Drehen des Drehtellers keiner Scherbelastung ausgesetzt sind. Beim Hochfahren des Drehtellers im Anschluß an dessen Drehung wird auch die Absaugplatte wieder in dichtende Anlage mit der Unterseite des Drehtellers gefahren.

25 Bei allen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung erstrecken sich die Einschübe vorzugsweise radial bezüglich des Drehtellers, wobei die Reaktionsgefäße in zumindest einer Reihe angeordnet sind. Zur Vergrößerung der Kapazität der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist jeder Einschub vorzugsweise zwei 30 zueinander parallele, sich radial erstreckende Reihen Reaktionsgefäße auf.

Die Einschübe der erfindungsgemäßen Vorrichtung bestehen vorzugsweise aus Kunststoff, insbesondere aus PEEK (Polyetheretherketon). Es ist bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung nicht 35 notwendig, die Einschübe aus Edelstahl oder aus Glaskeramik

herzustellen, da die Einschübe keiner abrasiven Beanspruchung unterliegen.

Jeder Einschub ist gemäß einer bevorzugten Ausführungsform so
5 ausgestaltet, daß er auf seinen Längsseiten mindestens eine
Codiernut und/oder einen Codiervorsprung aufweist. Die Codier-
nut eines Einschubs wirkt mit einem komplementär geformten
Codiervorsprung des Drehtellers zusammen und ein Codiervor-
sprung des Einschubs wirkt mit einer komplementär geformten
10 Codiernut des Drehtellers zusammen. Bei jedem Einschub ist
mindestens die Codiernut oder der Codiervorsprung verschieden
von den anderen Einschüben ausgeführt, so daß ein bestimmter
Einschub nur an einer bestimmten Stelle in den Drehteller
eingeschoben werden kann. Die Einschübe können auch mehrere
15 Codiernuten und/oder Codiervorsprünge aufweisen.

Vorzugsweise sind die Codiernuten und Codiervorsprünge der
Einschübe so ausgestaltet, daß alle Einschübe einer erfindungs-
gemäßen Vorrichtung zu Reaktionsgefäßplatten zusammensetzbar
20 sind, beispielsweise zu Reaktionsgefäßplatten im MTP-Format.
Das weitere Handling der mittels der erfindungsgemäßen Vorrich-
tung hergestellten Oligonukleotide wird so vereinfacht.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand eines Ausführungs-
25 beispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Bezugnahme
auf die beigefügten schematischen Figuren näher erläutert. Es
zeigt:

Fig. 1 ein Funktionsschema eines Ausführungsbeispiel einer
30 erfindungsgemäßen Vorrichtung zur parallelen Herstel-
lung von 96 Oligonukleotiden,

Fig. 2 einen in der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten
Einschub im in der Vorrichtung befindlichen Zustand,
35 und


Fig. 3 eine Reihe unterschiedlich kodierter Einschübe, von denen jeweils vier zu einer Reaktionsgefäßplatte im MTP-Format kombinierbar sind.

Figur 1 zeigt in der Mitte schematisiert eine Vorrichtung 10 zur parallelen Herstellung von 96 Oligonukleotiden. Wesentliche Bestandteile der Vorrichtung 10 sind drei übereinander angeordnete plattenförmige Gebilde, nämlich eine oben angeordnete Ventilträgerplatte 12, eine unten angeordnete Absaugplatte 14 und ein zwischen diesen beiden Platten angeordneter Drehteller 16. Dieser Drehteller 16 kann relativ zu der drehfesten Ventilträgerplatte 12 und der ebenfalls drehfesten Absaugplatte 14 gedreht werden.

In dem Drehteller 16 befinden sich vier herausnehmbare Einschübe 18, in denen jeweils vierundzwanzig Reaktionsgefäße 20 ausgebildet sind, die in zwei parallelen Reihen zu je zwölf Reaktionsgefäßen 20 angeordnet sind (siehe Figur 2). Jedes Reaktionsgefäß 20 ist oben und unten durch je einen Frittenboden 22 verschlossen und enthält Glaskügelchen aus CPG (controlled pore glass), an die die jeweiligen Startbasen gebunden sind. Jedes Reaktionsgefäß 20 hat oben einen Reaktionsgefäßeinlaß 24 und unten einen Reaktionsgefäßauslaß 26. Die vier Einschübe 18 sind in dem runden Drehteller 16 unter einem Abstand von jeweils 90° zum nächsten Einschub 18 derart angeordnet, daß sie radial in den Drehteller 16 eingeführt und aus ihm herausgezogen werden können.

Die Vorrichtung 10 weist vier separate Stationen 28, 30, 32, 34 auf, an denen bestimmte, zur Oligonukleotidsynthese erforderliche Operationen durchgeführt werden. Die Stationen 28, 30, 32 und 34 folgen in Drehrichtung r des Drehtellers 16 im Abstand von jeweils 90° aufeinander. An jeder Station 28, 30, 32, 34 ist in oder auf der Ventilträgerplatte 12 eine Flüssigkeitszuführeinrichtung 36 mit vierundzwanzig Zuführventilen 38 derart angeordnet, daß jedem Reaktionsgefäßeinlaß 24 ein Zuführventil 38 zugeordnet ist. An jeder Station 28, 30, 32, 34 ist des weiteren unterhalb jedes Reaktionsgefäßauslasses 26 ein

Ablaßkanal 40 in der Absaugplatte 14 ausgebildet, durch den aus dem zugehörigen Reaktionsgefäß 20 austretende Flüssigkeit abgeführt wird.

5 Der Drehteller 16 ist mittels einer nicht dargestellten Hub- und Senkeinrichtung relativ zur Ventilträgerplatte 12 absenkbar. Mit derselben Hub- und Senkeinrichtung kann auch die Absaugplatte 14 relativ zur Ventilträgerplatte 12 und zum
10 Hub- und Senkeinrichtung können demnach die Reaktionsgefäßeinlässe 24 aller Reaktionsgefäße 20 dichtend an die zugeordneten Zuführventile 38 und die Ablaßkanäle 40 dichtend an die zugeordneten Reaktionsgefäßauslässe 26 angelegt werden. Bei der
 dargestellten Ausführungsform hat der Drehteller 16 eine plane
15 Oberseite 42, die mit einer planen Anlagefläche 44 der Ventilträgerplatte 12 zusammenwirkt, und eine plane Unterseite 46, die mit einer planen Anlagefläche 48 der Absaugplatte 14 zusammenwirkt. Die eigentliche Abdichtung zwischen der Oberseite 42 des Drehtellers 16 und der Anlagefläche 44 und zwischen der
20 Unterseite 46 des Drehtellers 16 und der Anlagefläche 48 übernehmen O-Ringe aus Elastomermaterial, die um jeden Reaktionsgefäßeinlaß 24 und jeden Reaktionsgefäßauslaß 26 herum angeordnet sind und entweder in die Oberseite 42 oder die Anlagefläche 44 und in die Anlagefläche 48 oder die Unterseite 46 des Drehtellers 16 eingelassen sind.

Im folgenden wird die Funktion der Vorrichtung 10 zur Oligonukleotidsynthese näher erläutert. Angenommen sei dabei, daß sich in jedem Reaktionsgefäß 20 ein Festphasenträger (feinkörniges
30 CPG-Glassubstrat) befindet, an den ein erstes Nukleotid (Startbase) gebunden ist. Weitere Nukleotide sollen an dieses erste Nukleotid gebunden werden. Erwähnt sei, daß jedes neu hinzugegebene Nukleotid sich nur mit einem seiner Enden, dem sogenannten 3'-Ende ankoppeln kann, weil sein anderes Ende, das
35 sogenannte 5'-Ende, mit einer Schutzgruppe (DMT-Gruppe) versehen ist, die verhindert, daß die dem Reaktionsgefäß 20 neu zugegebenen Nukleotide untereinander reagieren.

Beginnend an einer ersten Station 28 werden in einer sogenannten Deblock-Operation die DMT-Gruppen (Schutzgruppen) von dem an dem Festphasenträger gebundenen Startnukleotid (oder einer mittlerweile gebildeten Nukleotidkette) abgespalten, um das 5'-Ende des Nukleotidstrangs reaktionsfähig zu machen. Die Abspaltung der Schutzgruppen wird durch Zugabe von TCA (Trichloressigsäure; genauer 3%-ige Trichloressigsäure in Dichlormethan) erreicht. Hierzu werden die Zuführventile 38 der ersten Station 28, die über eine Leitung 50 mit einem Vorratsbehälter 52 für TCA verbunden sind, 5 Sekunden geöffnet und dann wieder geschlossen. Die den Reaktionsgefäßen 20 zugegebene TCA-Lösung verbleibt dann 50 Sekunden lang in den Reaktionsgefäßen 20. Sodann wird durch Anlegen von Unterdruck an die Ablasskanäle 40 der ersten Station 28 die TCA-Lösung aus den Reaktionsgefäßen 20 abgesaugt.

Der Drehteller 16 und die Absaugplatte 14 werden dann abgesenkt, bis sich zwischen der Oberseite 42 des Drehtellers 16 und der Anlagefläche 44 sowie zwischen der Unterseite 46 des Drehtellers 16 und der Anlagefläche 48 ein kleiner Spalt gebildet hat. Darauf hin wird der Drehteller 16 um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, so daß der sich zu Beginn in der ersten Station 28 befindende Einschub 18 mit seinen Reaktionsgefäßen 20 sich nunmehr in der zweiten Station 30 befindet. Die Absaugplatte 14 und der Drehteller 16 werden wieder in dichtende Anlage miteinander und mit der Ventilträgerplatte 12 gefahren.

In der zweiten Station 30 findet eine erste Wasch-Operation statt, während der die Reaktionsgefäße 20 intensiv gespült werden. Dies geschieht durch Zugabe von Acetonitril, wozu die Zuführventile 38 der zweiten Station 30, die über eine Leitung 54 mit einem Acetonitril-Vorratsbehälter 56 verbunden sind, geöffnet werden. Die Acetonitril-Lösung läuft durch die Reaktionsgefäßeinlässe 24 in jedes Reaktionsgefäß 20 und aus den Reaktionsgefäßauslässen 26 wieder heraus in die Ablasskanäle 40 der zweiten Station 30.

In die Ablasskanäle 40 der zweiten Station 30 integriert ist eine Meßeinrichtung 58, mittels derer online die Qualität der an der ersten Station 28 stattgefundenen Deblock-Operation überprüft werden kann. Hierzu wird die aus den Reaktionsgefäßen 20 strömende Acetonitril-Lösung durch Messung ihrer Leitfähigkeit oder durch Messung ihrer Farbintensität untersucht. Die in der Deblock-Operation entfernten Schutzgruppen lassen sich beispielsweise optisch als orange Einfärbung der Acetonitril-Lösung erkennen. Stellt die Meßeinrichtung 58 keine solche Einfärbung mehr fest, kann davon ausgegangen werden, daß alle entfernten Schutzgruppen aus den Reaktionsgefäßen 20 herausgespült worden sind. Veranschlagt wird hierfür eine Zugabezeit von 15 Sekunden, jedoch wird die Acetonitril-Lösung aus dem Behälter 56 den Reaktionsgefäßen 20 mittels der Zuführventile 38 solange zugeführt, bis keine Einfärbung der die Reaktionsgefäße verlassenden Flüssigkeit mehr festgestellt werden kann.

Sodann wird der Drehteller 16 wie zuvor beschrieben eine Station weiter gedreht. Der betrachtete Einschub 18 befindet sich damit in der dritten Station 32. Dort findet die eigentliche, kettenverlängernde Reaktion statt, die als Coupling-Operation bezeichnet wird. Zur Kettenverlängerung muß den sich in den Reaktionsgefäßen 20 befindenden Nukleotidketten eine weitere Nukleotid-Base zugegeben werden, die dann an das in der zweiten Station 30 reaktionsfähig gemachte Ende der Nukleotidkette koppelt. Zur Auswahl der gewünschten Nukleotid-Base steht die der dritten Station 32 zugeordnete Flüssigkeits-Zuführeinrichtung 36 in fluidleitender Verbindung mit einem Auswahlventilblock 60, der sieben Auswahlventile 62 aufweist. Je eines der Auswahlventile 62 ist mit einem Adenosin-Vorratsbehälter 64, einem Cytosin-Vorratsbehälter 66, einem Guanosin-Vorratsbehälter 68 und einem Thymidin-Vorratsbehälter 70 verbunden. Ein weiteres Auswahlventil 62 ist mit einem Vorratsbehälter 72 für Tetrazol verbunden, das als Aktivator dient. Die zwei restlichen Auswahlventile 62 sind mit Vorratsbehältern 74 und 76 verbunden, die beispielsweise Markierungsreagenzien enthalten können, etwa oder ein Farbstoff und Hapten. Solche Markierungsreagenzien können während der Coupling-Operation zugegeben

werden, um später eine Identifikation eines mit dem Oligonukleotid erzeugten Produktes zu ermöglichen.

Durch Öffnen des der gewünschten Nukleotid-Base zugeordneten Auswahlventiles 62 und der entsprechenden Zuführventile 38 kann die ausgewählte Nukleotid-Base den Reaktionsgefäßen 20 zugegeben werden. Als Zugabezeit werden etwa 2,5 Sekunden veranschlagt. Gleichzeitig mit der Nukleotid-Base und/oder kurz davor und, falls erforderlich, auch danach wird der Aktivator durch Öffnen des entsprechenden Auswahlventils 62 (und der Zuführventile 38) den Reaktionsgefäßen 20 zugegeben. Auf die Zugabe der Nukleotid-Basen und des Aktivators folgt eine Wartezeit von etwa 30 Sekunden, um den neu hinzugegebenen Bausteinen Zeit zu geben, an die bestehende Kette anzukoppeln.

In der dritten Station 32 kann allen Reaktionsgefäßen 20 dieselbe Nukleotid-Base zugegeben werden, beispielsweise Cytosin. Ebenso können jedoch unterschiedlichen Reaktionsgefäßen 20 unterschiedliche Nukleotid-Basen zugegeben werden, so daß in den verschiedenen Reaktionsgefäßen 20 unterschiedliche Oligonukleotidketten erzeugt werden. Dies läßt sich auf einfache Weise durch ein aufeinanderfolgendes Öffnen der den entsprechenden Vorratsbehälter 64 bis 70 freigebenden Auswahlventile 62 erreichen, wobei dann immer nur die denjenigen Reaktionsgefäßen 20 zugeordneten Zuführventile 38 geöffnet sind, in die die entsprechende Nukleotid-Base gelangen soll. Zeitlich stellt diese aufeinanderfolgende Zuführung verschiedener ausgewählter Nukleotid-Basen in unterschiedliche Reaktionsgefäße 20 kein Problem dar, denn die erforderliche Wartezeit von 30 Sekunden ist innerhalb der Taktzeit von 60 Sekunden auch dann noch gewährleistet, wenn alle vier Nukleotid-Basen zugegeben werden.

Nach Verstreichen der Wartezeit wird die sich in den Reaktionsgefäßen 20 befindende Reaktionslösung durch die der dritten Station 32 zugeordneten Abblaßkanäle 40 abgesaugt. Sodann wird der Drehteller 16 in der bereits beschriebenen Weise um eine Station weitergedreht, so daß der betrachtete Einschub 18 sich jetzt in der vierten Station 34 befindet.

In der vierten Station 34 finden nacheinander mehrere Operationen statt, nämlich eine zweite Wasch-Operation, eine Capping-Operation, eine dritte Wasch-Operation, eine Oxidations-Operation, und eine vierte Wasch-Operation. Hierzu steht die
5 der vierten Station 34 zugeordnete Flüssigkeits-Zuführeinrichtung 36 in flüssigkeitsleitender Verbindung mit einem zweiten Auswahlventilblock 78 mit drei Auswahlventilen 80. Das erste dieser Auswahlventile 80 ist mit einem Vorratsbehälter 82 für ein erstes Capping-Reagens verbunden, das zweite
10 Auswahlventil 80 mit einem Vorratsbehälter 84 für ein zweites Capping-Reagens, und das dritte Auswahlventil 80 mit einem Vorratsbehälter 86 für eine Jodlösung. Des weiteren kann ein Waschflüssigkeitsvorratsbehälter 52', der mit dem Vorratsbehälter 52 identisch sein kann, durch ein Ventil 88 flüssigkeits-
15 leitend mit der Flüssigkeits-Zuführeinrichtung 36 der vierten Station 34 verbunden werden. Durch Öffnen dieses Ventils 88 und aller Zuführventile 38 für etwa 15 Sekunden wird allen Reaktionsgefäßen 20 zur Ausführung der zweiten Wasch-Operation Acetonitril-Lösung zugeführt. Die Acetonitril-Lösung läuft durch die
20 Reaktionsgefäße 20 hindurch und in die Abblaßkanäle 40 der vierten Station 34 hinein.

Dann wird durch Schließen des Ventils 88 und Öffnen der entsprechenden Auswahlventile 80 etwa 3 Sekunden lang das im
25 Vorratsbehälter 82 enthaltene, erste Capping-Reagens und/oder das im Vorratsbehälter 84 enthaltene zweite Capping-Reagens den Reaktionsgefäßen 20 zugeführt. Die mit diesen Reagenzien durchgeführte, sogenannte Capping-Operation ist notwendig, weil nie 100% der in den Reaktionsgefäßen 20 enthaltenen Oligonukleotidketten in der vorhergehenden Coupling-Operation mit den neu hinzugegebenen Nukleotid-Bausteinen reagiert haben. Diejenigen Kettenenden, die in der Coupling-Operation nicht wie vorgesehen reagiert haben, müssen dauerhaft blockiert werden, um die
30 Bildung fehlerhafter Oligonukleotidketten zu vermeiden. Eine Wartezeit ist nach der Zugabe der Capping-Reagenzien nicht zu beachten, da diese Reagenzien äußerst schnell reagieren.

Auf die Capping-Operation folgt eine analog der zweiten Wasch-Operation durchgeführte dritte Wasch-Operation, wiederum für eine Zeitdauer von etwa 15 Sekunden.

5 Im Anschluß an die dritte Wasch-Operation folgt durch Schließen des Ventils 88 und Öffnen des dem Vorratsbehälter 86 für Jodlösung zugeordneten Auswahlventils 80 eine Oxidations-Operation, indem die Jodlösung aus dem Vorratsbehälter 86 durch die geöffneten Zuführventile 38 den Reaktionsgefäßen 20 etwa 2 Sekunden
10 lang zugeführt wird. Diese Oxidations-Operation stabilisiert durch Aufoxidation des Phosphors von P(III) zu P(V) das Phosphat-Grundgerüst der Oligonukleotidketten.



Schlußendlich wird analog der zweiten und der dritten Wasch-
15 Operation eine vierte Wasch-Operation für 15 Sekunden durchgeführt, um die Jodlösung aus den Reaktionsgefäßen 20 herauszuspielen. Damit ist ein Durchlauf des betrachteten Einschubs 18 beendet, an den sich weitere Durchläufe anschließen können, um die gewünschten Nukleotid-Ketten zu erzeugen. Nachdem die
20 erforderliche Anzahl von Umläufen pro Einschub 18 stattgefunden hat, kann der entsprechende Einschub aus dem Drehteller 16 seitlich entnommen werden und durch einen neuen, Start-Basen enthaltenden Einschub 18 ersetzt werden.

25 In den Figuren 2 und 3 sind die Einschübe 18 näher erläutert. Jeder Einschub 18 ist im wesentlichen stabförmig und weist zwei zueinander parallele Reihen Reaktionsgefäße 20 auf, beispielsweise 12 Reaktionsgefäße pro Reihe. An seinen Längsseiten ist jeder Einschub 18 mit zumindest einer Codiernut 90 oder mit
30 zumindest einem Codiervorsprung 92 versehen. Durch diese Codiernuten 90 und/oder Codiervorsprünge 92 ist sichergestellt, daß ein bestimmter Einschub 18 nur an einer bestimmten Position in den Drehteller 16 eingeschoben werden kann, nämlich an derjenigen Position, an der der Drehteller 16 Codiernuten 90'
35 (nicht dargestellt) oder Codiervorsprünge 92' aufweist, die den Codiernuten 90 oder den Codiervorsprüngen 92 des jeweiligen Einschubes 18 entsprechen. Eine Fehlbestückung des Drehtellers 16 ist somit nahezu ausgeschlossen.

Als weiterer Vorteil lassen sich die solchermaßen ausgestalteten Einschübe 18 zu Reaktionsgefäßplatten 94 im Standard MTP-Format zusammensetzen (siehe Figur 3), wobei auch dies nur in einer bestimmten, durch die Codiernuten 90 und Codiervorsprünge 92 der entsprechenden Einschübe 18 vorgegebenen Reihenfolge möglich ist.



1543



Patentansprüche

5 1. Verfahren zur parallelen Herstellung von wenigstens 4n Oligonukleotiden, mit den Schritten:

- Anordnen von wenigstens vier Einschüben mit je n Reaktionsgefäßen auf einem Teller derart, daß ein erster Einschub sich an einer ersten Station, ein zweiter Einschub sich an einer zweiten Station, ein dritter Einschub sich an einer dritten Station und ein vierter Einschub sich an einer vierten Station befinden, wobei jedes Reaktionsgefäß eine an einen inerten Träger gebundene Startbase oder einen Universalträger enthält,

- paralleles Durchführen von

15 a) einer Deblock-Operation zur Entfernung von Schutzgruppen gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der ersten Station befindenden Einschubes,

b) einer ersten Wasch-Operation gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der zweiten Station befindenden Einschubes,

20 c) einer Coupling-Operation zum Anfügen einzelner Nukleotide in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der dritten Station befindenden Einschubes, und

25 d) einer zweiten Wasch-Operation gefolgt von einer Capping-Operation zum Blockieren von Oligonukleotiden, die in der vorangegangenen Coupling-Operation nicht die gewünschte Kettenverlängerung erfahren haben, gefolgt von einer dritten Wasch-Operation gefolgt von einer Oxidations-Operation zum Stabilisieren des Phosphatgrundgerüsts der Oligonukleotide, gefolgt von einer vierten Wasch-Operation gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der vierten Station befindenden Einschubs, und

30 - stationsweises Rotieren der Einschübe durch die genannten vier Stationen oder der Stationen relativ zu den Einschüben und
35 Ausführen der zuvor genannten Operationen solange, bis die gewünschten Oligonukleotide durch Aneinanderkoppeln der einzelnen Nukleotide entstanden sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß an der zweiten Station zusammen mit
der dort durchgeführten ersten Wasch-Operation eine Monitoring-
Operation stattfindet, die Aufschluß über die Qualität der an
5 der ersten Station durchgeführten Deblock-Operation gibt.

3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Monitoring-Operation eine
Online-Messung der Leitfähigkeit einer für die erste Wasch-
10 Operation verwendeten Waschflüssigkeit umfaßt.

4. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Monitoring-Operation eine
Online-Messung der Farbintensität, insbesondere durch Messen
15 mittels UV-Licht, einer für die erste Wasch-Operation verwendeten
Waschflüssigkeit umfaßt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die erste Wasch-Operation solange
20 durchgeführt wird, bis die Monitoring-Operation ergibt, daß die
in der vorangegangenen Deblock-Operation entfernten Schutzgruppen
vollständig ausgespült sind.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet, daß bei der an der dritten Station
durchgeführten Coupling-Operation eine ausgewählte Nukleotid-
Base gleichzeitig mit einem Aktivator, vorzugsweise Tetrazol,
den Reaktionsgefäßen zugegeben wird.

30 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß bei der an der dritten Station
durchgeführten Coupling-Operation eine Markierungsgruppe,
insbesondere ein Basenanalogon, ein Farbstoff oder ein Hapten,
den Reaktionsgefäßen zugegeben wird.

35 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgefäße als Durchfluß-
gefäße ausgebildet sind, und daß die in den vier Stationen den

Reaktionsgefäßen zuzuführenden Flüssigkeiten durch Anlegen eines Druckgefälles zwischen Reaktionsgefäßeinlaß und Reaktionsgefäßauslaß in die Reaktionsgefäße hinein und aus ihnen heraus befördert werden.

5

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß alle Operationen unter einer Schutzgasatmosphäre durchgeführt werden, insbesondere unter Stickstoff und/oder Argon.

10

10. Vorrichtung zur parallelen Herstellung von wenigstens 4n Oligonukleotiden, mit

- einer ersten Station (28) zur Durchführung einer Deblock-Operation,

15 - einer zweiten Station (30) zur Durchführung einer ersten Wasch-Operation,

- einer dritten Station (32) zur Durchführung einer Coupling-Operation,

20 - einer vierten Station (34) zur Durchführung einer zweiten Wasch-Operation gefolgt von einer Capping-Operation gefolgt von einer dritten Wasch-Operation gefolgt von einer Oxidations-Operation gefolgt von einer vierten Wasch-Operation, wobei die erste, die zweite, die dritte und die vierte Station in Umfangsrichtung mit Abstand aufeinanderfolgen,

25 - einem Teller (16), der wenigstens vier Einschübe (18) mit je n Reaktionsgefäßen (20) derart aufweist, daß ein erster Einschub (18) sich an der ersten Station (28), ein zweiter Einschub (18) sich an der zweiten Station (30), ein dritter

30 Einschub (18) sich an der dritten Station (32) und ein vierter Einschub (18) sich an der vierten Station (34) befindet, wobei jedes Reaktionsgefäß (20) als Durchflußgefäß mit einem Reaktionsgefäßeinlaß und einem Reaktionsgefäßauslaß ausgebildet ist,

- einer Einrichtung zum Ausführen einer stationsweisen Relativbewegung zwischen dem Teller (16) und den Stationen (28, 30, 32, 34),

35 - einer in jeder Station (28, 30, 32, 34) unmittelbar den Reaktionsgefäßeinlässen zugeordneten Flüssigkeits-Zuführ-einrichtung (36), und

- einem in jeder Station (28, 30, 32, 34) unmittelbar jedem Reaktionsgefäßauslaß zugeordneten Ablaßkanal (40), wobei jeder Reaktionsgefäßeinlaß in dichtendem Eingriff mit der zugehörigen Flüssigkeits-Zuführeinrichtung (36) und jeder Reaktionsgefäßauslaß in dichtendem Eingriff mit dem zugehörigen Ablaßkanal (40) ist, wenn sich die Einschübe (18) in einer Station (28, 30, 32, 34) befinden, und wobei zumindest zwischen den Reaktionsgefäßeinlässen und der Flüssigkeits-Zuführeinrichtung (36) ein kleiner axialer Abstand besteht, während eine stationsweise Relativbewegung zwischen dem Teller (16) und den Stationen (28, 30, 32, 34) stattfindet.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß auch zwischen den Reaktionsgefäßauslässen und den Ablaßkanälen (40) ein kleiner axialer Abstand besteht, während eine stationsweise Relativbewegung zwischen dem Teller (16) und den Stationen (28, 30, 32, 34) stattfindet.

12. Vorrichtung nach Anspruch 10 oder 11,

dadurch gekennzeichnet, daß der Teller (16) ein Drehteller ist und daß alle Flüssigkeits-Zuführeinrichtungen (36) in oder auf einer Ventilträgerplatte (12) und alle Ablaßkanäle (40) in einer Absaugplatte (14) aufgenommen sind, wobei die Ventilträgerplatte (12) eine plane Anlagefläche (44) zur Oberseite des Drehtellers (16) und die Absaugplatte (14) eine plane Anlagefläche (48) zur Unterseite des Drehtellers (16) aufweist, und daß die Reaktionsgefäßeinlässe bündig mit der Oberseite des Drehtellers (16) und die Reaktionsgefäßauslässe bündig mit der Unterseite des Drehtellers (16) ausgebildet sind.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 12,

dadurch gekennzeichnet, daß jede Flüssigkeits-Zuführeinrichtung (36) n Zuführventile (38) aufweist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13,

dadurch gekennzeichnet, daß die Ventilträgerplatte (12) und die Absaugplatte (14) drehfest sind, und daß der Drehteller (16)

und die Absaugplatte (14) relativ zur Ventilträgerplatte (12) absenkbar sind.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, daß jeder Einschub (18) sich radial im Teller (16) erstreckt und wenigstens eine Reihe, vorzugsweise zwei zueinander parallele Reihen, Reaktionsgefäße (20) aufweist.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Einschübe (18) aus Kunststoff bestehen, insbesondere aus Polyetheretherketon.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß jeder Einschub (18) an seinen Längsseiten eine verschieden ausgestaltete Codiernut (90) oder einen Codiervorsprung (92) aufweist, die mit einem entsprechenden Codiervorsprung (90') oder einer entsprechenden Codiernut (92') des Drehtellers (16) zusammenwirken.

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Einschübe (18) mittels der Codiernuten (90) und Codiervorsprünge (92) zu Reaktionsgefäßplatten (94) zusammensetzbar sind.

Zusammenfassung

5

Verfahren und Vorrichtung zur parallelen Herstellung von
wenigstens $4n$ Oligonukleotiden

10 Bei einem Verfahren und einer Vorrichtung zur parallelen Herstellung von wenigstens $4n$ Oligonukleotiden werden zunächst wenigstens vier Einschübe mit je n Reaktionsgefäßen auf einem Teller (16) angeordnet, wobei jedes Reaktionsgefäß eine an einen inerten Träger gebundene Nukleotid-Startbase enthält.

15 Sodann werden an vier Stationen (28, 30, 32, 34) bestimmte Operationen parallel zueinander durchgeführt, und zwar eine Deblock-Operation gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der ersten Station (28) befindenden Einschubes, eine erste Wasch-Operation gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen

20 des sich an der zweiten Station (30) befindenden Einschubes, eine Coupling-Operation in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der dritten Station (32) befindenden Einschubes, und, gleichzeitig in allen n Reaktionsgefäßen des sich an der vierten Station (34) befindenden Einschubes, eine zweite Wasch-

25 Operation gefolgt von einer Capping-Operation gefolgt von einer dritten Wasch-Operation gefolgt von einer Oxidations-Operation gefolgt von einer vierten Wasch-Operation. Der Teller (16) mit den Einschüben wird stationsweise unter Ausführen der zuvor genannten Operationen solange rotiert, bis die gewünschten

30 Oligonukleotide durch Aneinanderkoppeln einzelner Nukleotide entstanden sind.

(Fig. 1)

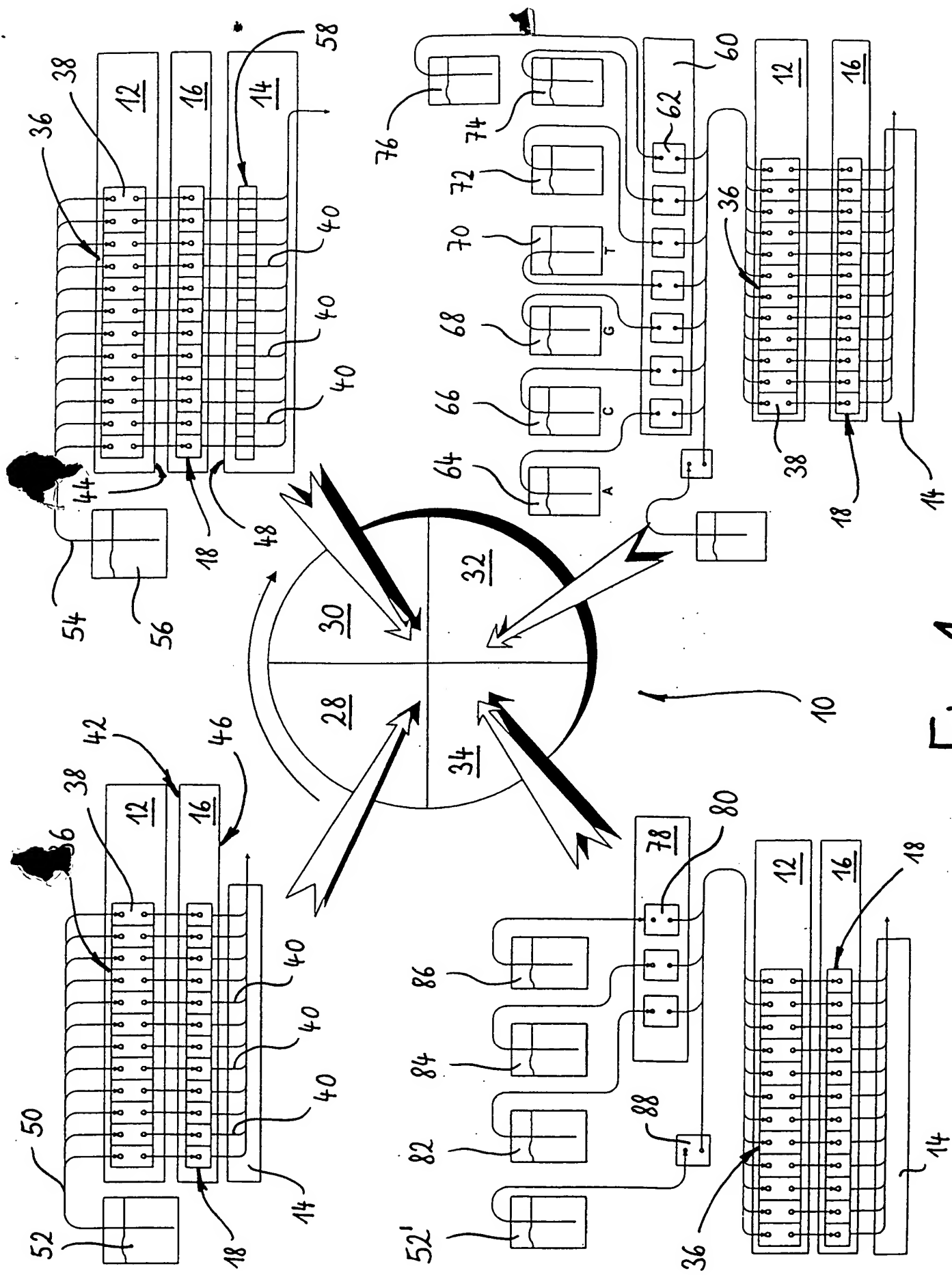


Fig. 1

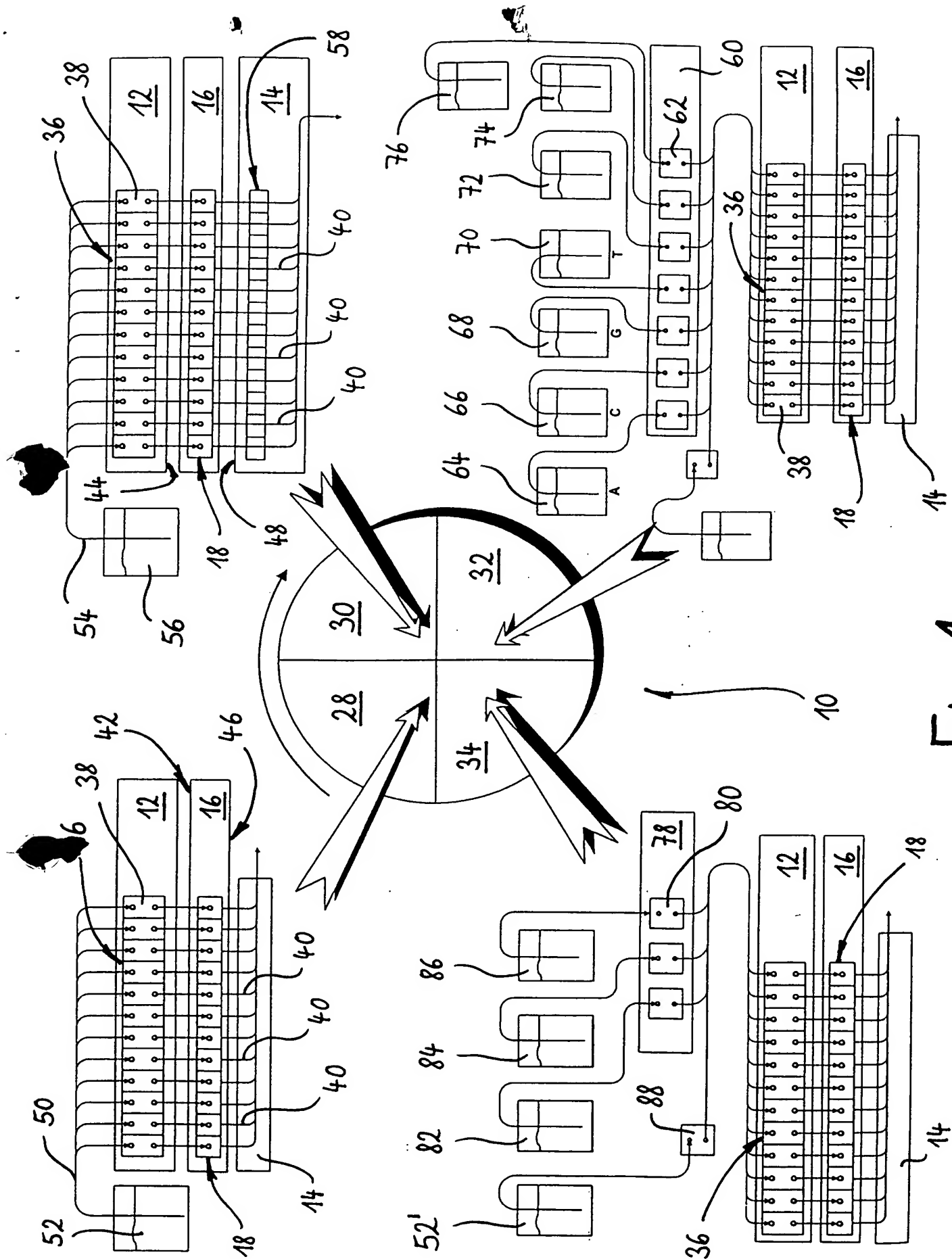


Fig. 1

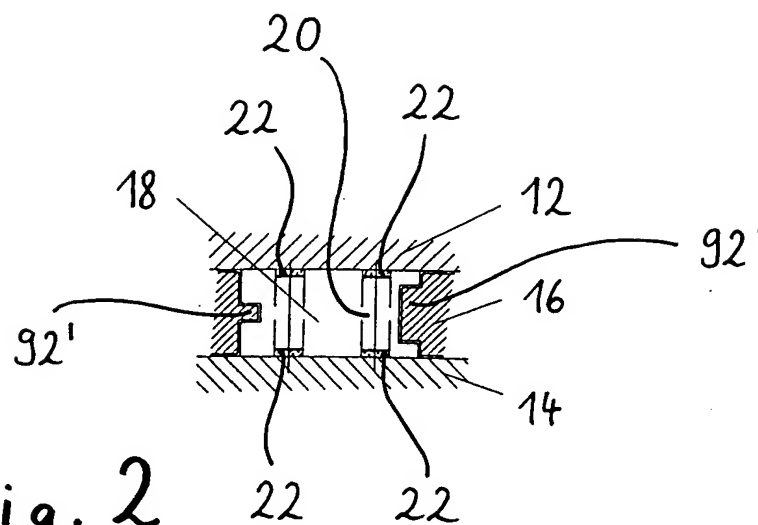


Fig. 2

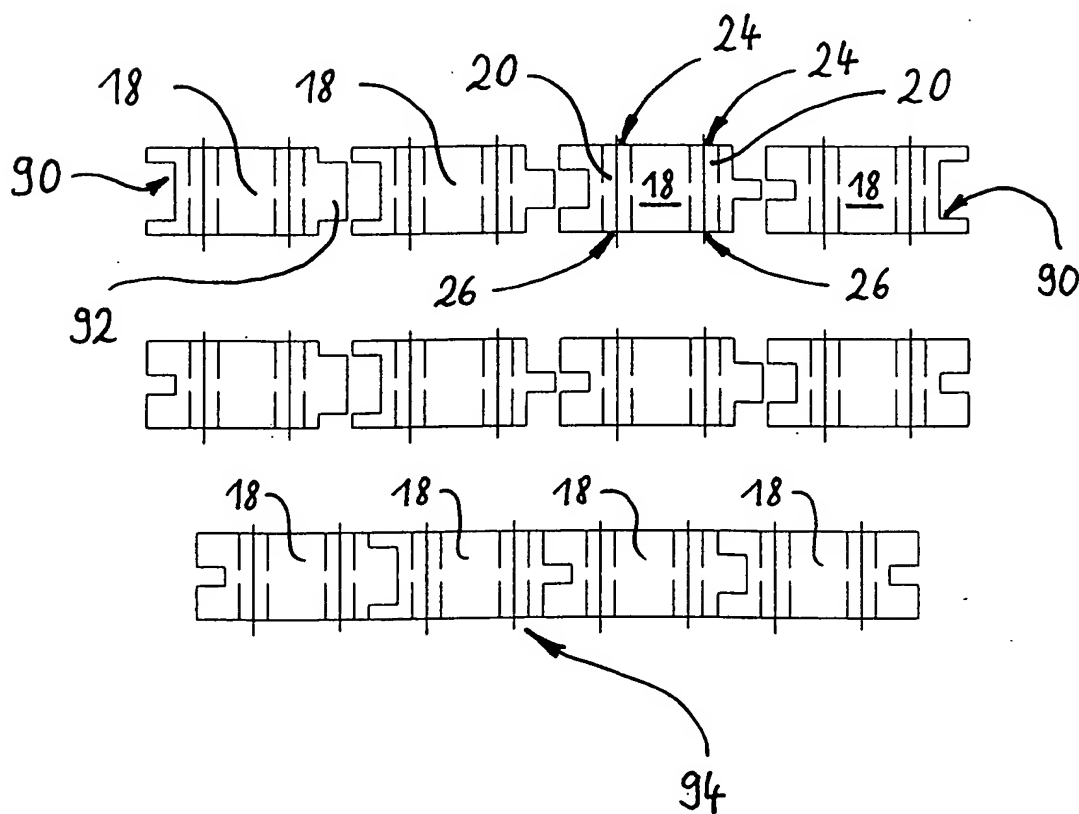


Fig. 3